细菌中 D-氨基酸生物合成及调控作用研究进展

薛二淑[1,2,3]，吴昊[1,2,3]，宋倩倩[1,2,3]，田开仁[1,2,3]，乔建军[1,2,3]，财音青格乐[1,2,3**]

（1 天津大学化工学院 天津 300072；2 系统生物工程教育部重点实验室 天津 300072；3 天津化学化工协同创新中心合成生物学平台 天津 300072）

摘要：细菌中普遍存在 L/D 型氨基酸，与 L-氨基酸（L-AAs）不同，D-氨基酸（D-AAs）不参与蛋白质合成，而与细胞壁肽聚糖的合成有关，直接影响细菌细胞壁的形状、数量和强度。D-AAs 在细菌表征、药物抑菌性、靶标确定等方面具有重要的作用。目前，外源添加 D-AAs 参与肽聚糖合成的机制已有一些研究进展，其荧光衍生物已应用于细菌可视化，特异性探测细胞壁形成/重塑、细菌生长和细胞形态。但 D-AAs 如何影响细菌生长及其抗逆性的机制尚未研究清楚。本文对 D-AAs 的研究现状进行了综述，重点介绍了 D-AAs 在细菌中的生物合成和参与细胞壁合成的机制，非典型 D-AAs 对细菌的调控以及在细菌可视化中的应用，并对 D-AAs 未来研究方向进行了展望。

关键词：肽聚糖，D-氨基酸，氨基酸异构酶，氨基酸转氨酶

Research Progress in the Biosynthesis and Regulation of D-amino acids in Bacterial

XUE Er-shu[1,2,3], WU-Hao[1,2,3], SONG Qian-qian [1,2,3], TIAN Kai-ren[1,2,3], QIAO Jian-jun[1,2,3], QINGGELE Cai-yin[1,2,3**]

(1. School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China; 2. Key Laboratory of Systems Bioengineering of Ministry of Education, Tianjin University, Tianjin 300072, China; 3. Syn Bio Research Platform, Collaborative Innovation Center of Chemical Science and Engineering, Tianjin University, Tianjin 300072, China）

Abstract:

L/D amino acids are common components in bacteria. Unlike L-amino acids (L-AAs), D-amino acids (D-AAs) are not involved in protein synthesis, but participate in the biosynthesis of cell wall peptidoglycan, directly affecting the shape, quantity

*国家自然科学基金资助项目（31570089）

**通讯作者，电子邮箱：qinggele@tju.edu.cn

and strength of bacterial cell wall. D-AAs play an important role in bacterial characterization, drug bacteriostasis, and target determination. At present, the mechanism that exogenous addition of D-AAs is involved in peptidoglycan synthesis has been studied and fluorescent derivatives applied to bacterial visualization, specifically detecting cell wall formation/remodeling, bacterial growth and cell morphology. However, the mechanism of how D-AAs affect bacterial growth and its resistance to stress has not been elucidated. This paper summarizes the current studies of D-AAs. The biosynthesis pathway of D-AAs in bacteria, mechanism of cell wall synthesis and the effects of non-canonical D-amino acids on bacterial regulation, and its application in bacterial visualization were highlighted. In the end, the future research direction of D-AAs are prospected.

Keywords: Peptidoglycan, D-amino acid, amino acid isomerase, amino acid aminotransferase

1 引言

除 Gly 外，组成蛋白质的 19 种氨基酸都是α-氨基酸，自然界中均以两种立体异构形式 L-氨基酸（L-AAs）和 D-氨基酸（D-AAs）存在。生物体有效地选择了 L-AAs 作为核糖体合成多肽的基本单元和系统中关键代谢的中间体，在自然界中比 D-AAs 具有更高的丰度。尽管如此，关于 D-AAs 潜在作用的研究从未停止[1]。D-AAs 广泛存在于微生物、植物和动物细胞中，并且在食品、医药和化妆品行业中应用[2]。许多细菌生长的培养基中均检测到 D-AAs，如：霍乱弧菌（*Vibrio cholerae*）、枯草芽孢杆菌（*Bacillus subtilis*）等[3-6]，其参与微生物的新陈代谢[7-10]，调节多种生理变化，例如细胞壁生物合成、生物膜完整性和孢子萌发[4, 11-13]。

D-AAs 主要参与细菌细胞壁 PG 的形成。细胞壁是位于细胞膜外的网状聚合物，对保持细胞完整性，维持细胞形状稳定起着重要作用。PG 是细胞壁的必需和特异性成分，并为细胞壁其它组分提供锚定位点[14]。PG 聚合物链主要由 N-乙酰葡萄糖胺（GlcNAc）-N-乙酰胞壁酸（MurNAc）--五肽交联形成[15]。在革兰氏阳性（G^+）细菌和革兰氏阴性（G^-）细菌中五肽成分又有所不同，G^+ 菌为 L-Ala-D-Glu/Gln-L-Lys-D-Ala-D-Ala，G^- 菌为 L-Ala-D-Glu/Gln-m-DAP-D-Ala-D-Ala，主要为第三位氨基酸的不同，G^+菌中为 L-Lys，G^-菌中为内消旋-二氨基庚二酸（m-DAP），是 Lys 的非手性羧基衍生物。如图 1。不同细菌中，相邻肽链之间的连接方式也有所差异，G^+细菌中，相邻的肽链直接交联或通过肽桥连接产生位置 2（D-Glu/Gln）-4（D-Ala）或 3（L-Lys）-4（D-Ala）连接。在 G^-细菌中，通

过交联产生丰富的 3（m-DAP）-4（D-Ala）连接或不太常见的 3（m-DAP）-3（m-DAP）连接[16-18]。PG 的组装和成熟需要转糖基、转肽（TP）和羧肽（CP）等过程[15]。值得注意的是，细胞壁 PG 肽链的组成会随着在培养基中外加 D-AAs 而发生改变。下面对 D-AAs 的研究进行了详细介绍，并对其发展前景进行了展望。

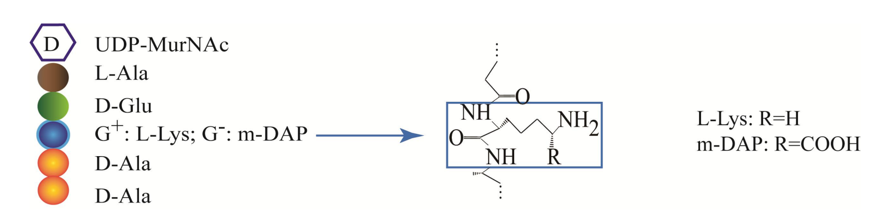


图 1 D-AAs 合成 PG 侧链[5, 19]

Fig. 1 D-AAs synthetic peptidoglycan sidechain [5, 19]

2 细菌中 D-AAs 的合成

细菌中 D-AAs 的合成主要有两种形式，一种是氨基酸异构酶（Isomerase）催化 L-和 D-立体异构体的相互转化，该反应是可逆反应，如图 2a。氨基酸异构酶分为差向异构酶（催化含有两个或两个以上手性中心的氨基酸）和消旋酶（催化只含有一个手性中心的氨基酸）。另一种是相应氨基酸的α-酮酸通过 D-氨基酸转氨酶（D-Amino Acid aminotransferase，D-AAT）立体特异性转化形成 D-AAs，这一反应也是可逆的[1]，如图 2b。

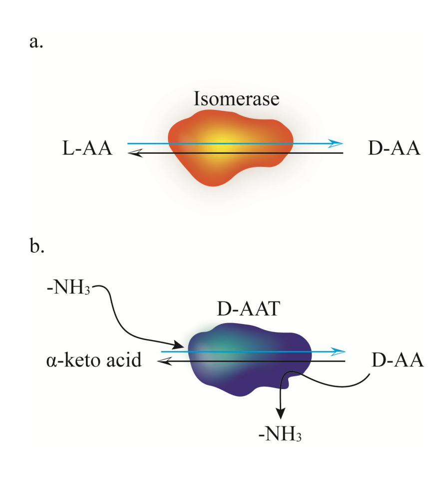


图 2 D-AAs 的合成

Fig. 2 Biosynthesis of D-AAs

a: L- and D-stereoisomer conversion[5] , b: Stereospecific transformation of α-keto acid[1]

2.1 氨基酸消旋酶

尽管在细菌中鉴定得到了多个合成 D-AAs 的消旋酶，但大多数 D-AAs 消旋酶只针对某些特定的氨基酸进行转化。根据是否需要辅因子吡哆醛-5-磷酸（PLP），氨基酸消旋酶可分为两类：PLP 依赖性消旋酶和 PLP 非依赖性消旋酶[20]。已有文献报道的消旋酶中，Ala 消旋酶[21]、Ser 消旋酶[22]、Lys 消旋酶[23]和广谱消旋酶[24]是 PLP 依赖性消旋酶，Pro 消旋酶[25]、Asp 消旋酶[13, 16]和 Glu 消旋酶[26, 27]是 PLP 非依赖性消旋酶。下面依据其合成氨基酸是否参与常规 PG 的合成来分类介绍。

2.1.1 Ala 消旋酶、Asp 消旋酶和 Glu 消旋酶

Ala 消旋酶参与 PG 合成和氨基酸代谢、抑制孢子的形成。在没有外源 D-Ala 来源的情况下，缺乏 Ala 消旋酶通常是致命的。一些 G^-细菌编码两种 Ala 消旋酶：组成型 Alr 和诱导型 DadX，分别用于 D-Ala 生物合成和 D-Ala 的分解代谢[28]。在代谢过程中，L-Ala 促进孢子的形成，而 D-Ala 抑制孢子萌发。Asp 消旋酶只存在于少数细菌中，例如乳酸菌（*Lactic acid Bacteria*），Asp 消旋酶合成的 D-Asp 主要用于肽链交联时肽桥的合成。Glu 消旋酶对 Glu 的外消旋化具有高度特异性，在乳杆菌（*Lactobacillus*）、片球菌（*Pediococcus*）和葡萄球菌（*Staphylococcus*）中，Glu 消旋酶是 D-Glu 合成的必需酶[27]。最近在 *Bacillus subtilis* 中，已鉴定出两种 Glu 消旋酶 YrpC 和 RacE，YrpC 为 PG 的合成提供 D-Glu，RacE 的活性与聚 γ - D-Glu 的合成相关[29, 30]。

2.1.2 其他消旋酶

Ser 消旋酶在一些 G^+细菌，例如粪肠球菌（*Enterococcus faecalis*）中被发现，是唯一已知具有跨膜结构域的消旋酶，研究显示 Ser 消旋酶还具有 Ala 消旋酶活性[20]。Lys 和 Arg 立体异构的转化有两种消旋酶：Lys 消旋酶和广谱消旋酶，当两种酶同时存在时，Lys 消旋酶优先作用[31]。目前，仅在少数真核生物和致病菌中发现 Pro 消旋酶，例如梭菌（*Clostridium Prazmowski*）、艰难梭菌（Clostridium difficile）、克氏锥虫（Thermococcus litoralis）等。除底物特异性的消旋酶之外，有一种广谱消旋酶（Broad spectrum racemase, Bsr），能够接受多种氨基酸作为底物发生消旋反应。迄今为止，已表征的 Bsr 家族的消旋酶只存在于少数 G^-菌体中。*V. cholerae* 中，BsrV 能可逆地对 10 种天然手性氨基酸进行消旋作用，包括非β-支化脂肪族氨基酸（Ala、Leu、Met、Ser、Cys、Gln 和 Asn）和带正电荷的氨基酸（His、Lys 和 Arg）[31]。G^+细菌中，如 *B. subtilis*，Espaillat 等[32]在培养液中检测到 D-AAs，但菌体中未找到类似 BsrV 编码基因的直系同源基因，推测存在类似 Bsr 家族功能的其它基因[3]。

最近，Kawakami 等[32-34]在超嗜热古菌（*Pyrococcus horikoshii* OT-3）中鉴定得到了一种新型的 G^+广谱氨基酸消旋酶（PH0138），分光光度测定和超高效液相色谱（UPLC）初步分析结果表明，该酶主要对 Met、Leu、Phe、Ala、Ser、Ile、Val、Trp 和 Tyr 具有消旋作用。

2.2 差向异构酶和氨基酸转氨酶

相对于消旋酶而言，差向异构酶在细菌中存在较少。Mutaguchi 等[35]实验证明γ-氨基丁酸氨基转移酶催化非极性氨基酸的外消旋化，通过高效率的差向异构化作用，使 L/D-Ile 相互转化。D-AAT 是 PLP 依赖性酶，催化各种 D-AAs 和α-酮酸之间的可逆转氨作用[36]。除 Lys 和 Thr 外，其余α－氨基酸都可由转氨酶合成。Fotheringham 等[37]在芽孢杆菌（*Bacillus*）中发现了基因 *dat* 编码 D-AAT，其可以催化合成 D-Glu。

3. D-AAs 参与 PG 合成

3.1 PG 中普遍含有的 D-AAs

D-AAs 是细菌细胞壁 PG 不可缺少的部分，影响着细胞壁的形状、数量和强度[3]。参与 PG 合成的 D-AAs 主要包括 D-Ala、D-Glu/Gln 和 D-Asp；两个 D-Ala 通过 Ddl（D-Ala-D-Ala 连接酶）连接形成 D-Ala-D-Ala，之后与短肽链的第 3 位连接，形成单糖五肽，如图 1。D-Asp/Asn 主要是部分菌体肽链交联时肽桥的组成成分。

3.2 非典型 D-AAs 参与 PG 合成

细菌生长的培养基中检测到非 PG 组成的 D-AAs，称为非典型 D-AAs（Non-canonical D-amino acids, NCDAAs）。有意思的是，向培养基中添加 NCDAAs，可在细菌 PG 中检测到其存在[15, 19, 38]。Felipe 等[5]证明外源添加 NCDAAs 可以参与 PG 合成，即使该 D-AAs 细菌本身不能合成。类似的，Gly 也被证明可以取代细菌 PG 中肽链的第 1、4 或 5 位的 Ala[39]。D- Met、D-Trp 或 D-Phe 等可替代 *E. coli* PG 中肽链第 4 位的 D-Ala，而外源添加 L-异构体对 PG 的结构没有影响，且不会参与到 PG 合成中。进一步研究发现，外源添加高浓度 D-AAs 会抑制菌体生长，而低浓度的 D-AAs 对生长速率或形态改变却没有明显影响，但是可使 PG 合成和交联受到影响，导致单位细胞 PG 含量的减少。推测可能原因是，（1）D-AAs 与 L, D-转肽酶底物竞争，模仿天然底物，干扰转肽酶的活性；（2）D-AAs 至少抑制了一种可催化 PG 合成和交联的高分子量青霉素结合蛋白的活性[40]。

3.3 NCDAAs 参与 PG 合成的机制

PG 的生物合成需要多种酶协调作用。前期需要 Mur 家族合成二糖五肽，后期需要青霉素结合蛋白（PBPs）等合成聚糖链并进行修饰，如图 3。二糖五肽通过转肽酶交联相邻的聚糖链[41]，参与这些酶促反应的大多数蛋白质是 PBPs，根据保守功能结构域的不同，可分为三类：A 类、B 类、C 类[42]。Lupoli 等[19]通过以单个氨基酸为底物的体外实验，证明在 *E. coli* 中 PBP1A 可将 D-Phe、D-Trp、D-Tyr 通过 TP 取代 D-Ala 引入到 PG 中。Lebar 等[43]进一步研究证明 *B. subtilis* PBP1 催化 NCDAAs 和 D-氨基甲酰胺结合到新生的 PG 中，但 *E. coli* PBP1A 仅交换 NCDAAs。在 *V. cholerae* 中，NCDAAs 的引入涉及两种酶，一种是存在于细胞质中的 Ddl，催化 D-Ala-D-Ala 的合成，但由于底物的特异性不强，导致 D-Ala-NCDAAs 合成；另一种是周质中 Ldt，可将 NCDAAs 替换到肽链上[5]。Fura 等人[15]发现 NCDAAs 发生替换与转肽反应有关，推测 *B. subtilis* D, D-羧肽酶（PBP5）活性的增高，导致 PBP 转肽酶活性的提高，因此 NCDAAs 替换率也相应增大。

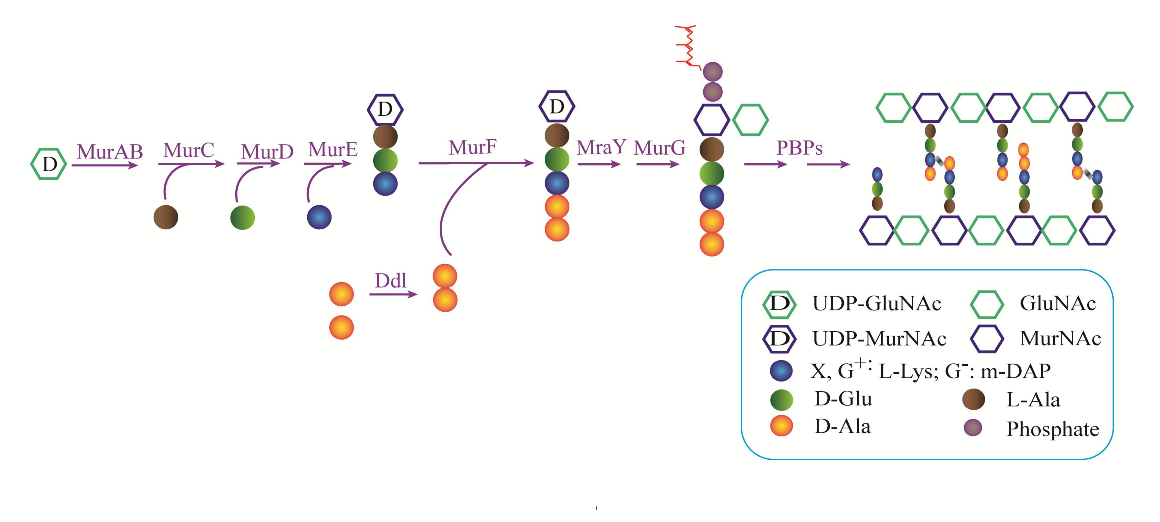


图 3　PG 的生物合成机制[4, 5, 15]

Fig.3　PG biosynthesis mechanism[4, 5, 15]

MurAB, C, D, E, F, G, MraY: Peptide chain synthesis related enzyme

NCDAAs 参与 PG 合成的机制主要有两种：（1）周质中 L, D-转肽酶，如 LdtA 和 LdtB，将 NCDAAs 直接替换到交联肽链部分的第 4/5 位；（2）通过 ABC 转运蛋白将 D-AAs 转运到细胞质中，Ddl 催化形成 D-Ala-NCDAAs 二肽，随后通过 MurF 合成新肽链，并翻转至细胞质膜的外表面，通过转糖基和转肽掺入大分子胞壁中，如图 4 所示。

Caparrós 等[40]通过对 D-Trp 进行改性（分别为 N-乙酰基-D-Trp 和 D-Trp 甲基酯），以研究官能团如何干扰掺入反应，测定了其衍生物中氨基和羧基的作用。结果显示 D-Trp-甲酯可掺入 PG，而 N-乙酰基衍生物则没有。表明反应需要游离的α-D-氨基，但游离的羧基是

非必需的。Cava 等[5]通过体外实验验证了 *V. cholerae* 在稳定期可体内合成 NCDAAs，并促进 PG 的重塑，其中二糖五肽单体只有 10%发生替换，二聚体替换高达 96%，说明 NCDAAs 在二聚体上更容易发生替换。该报道不仅证明了介导 NCDAAs 参与 PG 合成的两种不同过程，即细胞质二糖五肽合成过程和周质肽链交联的过程。而且，也发现了多种细菌均可以将 NCDAAs 参与到细胞壁的合成中。

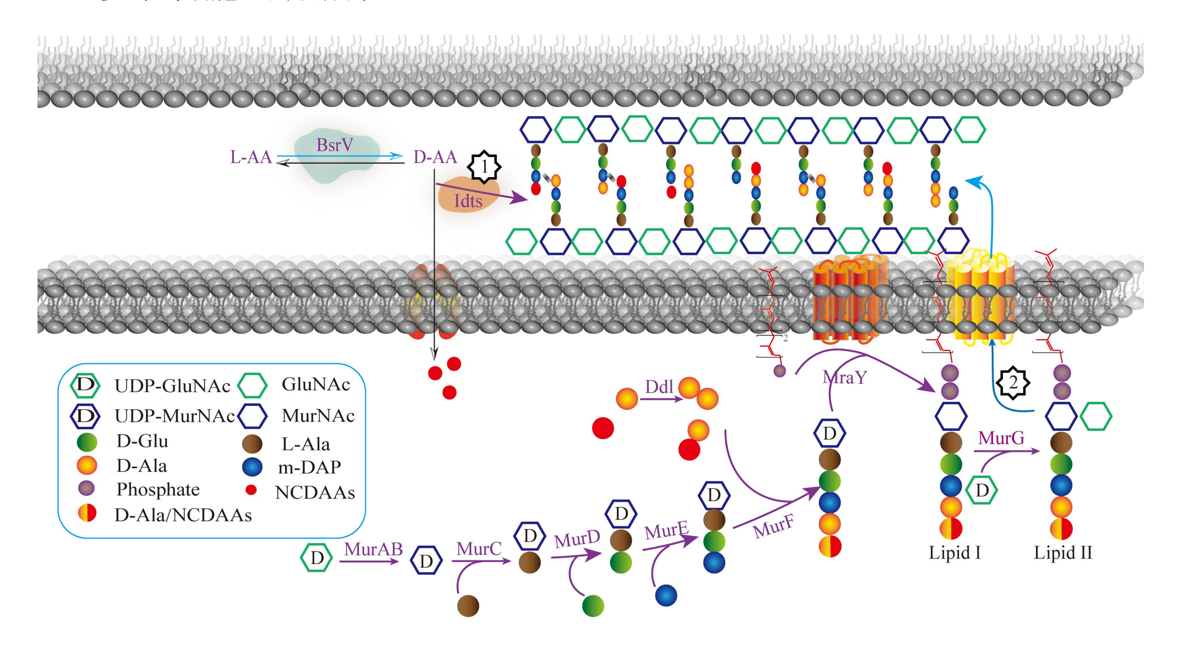


图 4 NCDAAs 参与 PG 合成的机制[4, 5, 15]

Fig. 4 NCDAAs participate in the mechanism of PG synthesis[4, 5, 15]

BsrV: Broad-spectrum racemase; Idts: L, D-transpeptidase linking Lpp to murein; NCDAAs: non-canonical D-amino acids; MurAB, C, D, E, F, G, MraY: Peptide chain synthesis related enzyme; Ddl: D-alanine-D-alanine ligase; murF: UDP-N-acetylmuramoyl-tripeptide-D-alanyl-D-alanine ligase

4. NCDAAs 对细菌的调控作用

NCDAAs 结合到 PG 会影响细菌细胞壁形状、数量和强度以及生物膜形成。最近的研究表明NCDAAs能直接调节周质转肽酶的活性[3]，作为信号分子，在特定条件下分解生物膜[12]，抑制孢子萌发[44]。

4.1 NCDAAs 对细菌细胞壁的调控作用

Caparrós 等[40]报道培养基中 D-AAs 的添加可以改变 PG 的合成和结构。培养基中加入 D-Met 单位细胞 PG 含量减少以及肽链上脂蛋白结合比例降低（下降了 27%）。与正常生长

的 PG 相比，被修饰的肽链占总 PG 的 45%，且 D-Met 能快速结合到肽链上，在 30 分钟左右出现新的、明显稳定的非常规 PG 聚合物。Lam 等[3]发现稳定期 BsrV 消旋酶合成的 D-Leu 和 D-Met 等，可以诱导杆状 *V. cholera* 成为球状，同时使细胞壁 PG 含量下降约 50%。BsrV 突变体菌株 PG 中聚糖链长度是野生型的约 80%，五肽减少 50%，并且三聚体寡肽增加 40%，表明其负调控细胞壁 PG 的合成。其可以帮助 *V. cholera* 应对外界环境压力。在抗逆实验中，野生型菌株比突变菌株表现出更强的存活率，说明其在稳定期控制细胞壁的完整性，通过减少 PG 合成并改变其细胞壁以适应稳定期的条件。

Cava 等[5]进一步发现 Ldts（LdtA/LdtB，LdtA 催化一些 G-细菌中肽链之间 DAP-DAP 交联; LdtB 催化 DAP 和脂蛋白（Lpp）之间共价结合）和 BsrV 突变体菌株 PG 含量均比野生型菌株高 1.7 倍左右，但 Ldts 突变体对低渗透压敏感性显著高于野生型菌株。通过对突变体 PG 含量和敏感性实验证明，Ldts 可以将 BsrV 产生的 NCDAAs 掺入 PG，控制稳定期 PG 的数量和强度，即调节每个细胞 PG 量并保持对低渗透压的抵抗力。最近，Alvarez 等[45]发现 D-Met 在 DacA1（D，D-羧肽酶）突变体中的毒性是由于高度积累含 D-Met 的五肽抑制 PG 转肽酶活性（即 PBP），从而损害细胞壁，导致生长受损和形态改变。

4.2 NCDAAs 对细菌生物膜的调控作用

Tong 等[46]研究发现 D-Cys、D-Asp 和 D-Glu 以及三者的混合物显著提高了乳酸链球菌素（Nisin）对变形链球菌（*Streptococcus mutans, S. mutans*）的抗菌活性，抑制 *S. mutans* 生长和生物膜的形成。推测原因是 Nisin 处理后形成的孔可以促进 NCDAAs 渗透进入细胞，影响细胞的正常代谢。Aliashkevich 等[11]认为 D-Tyr、D-Pro、D-Phe 等 D-AAs 不会阻止细菌黏附在一起，而是通过影响胞外聚合物（Extracellular Polymeric Substances, EPS）的蛋白质组分来抑制菌落的生长，来影响生物膜的形成，而胞外多糖的产生和定位没有受到显著影响。

Kolodkin-Gal 等[12]报道，D-Tyr 可通过抑制 TasA 纤维与细胞壁的锚定影响生物膜的形成。*S. mutans* 中荧光标记 TasA 纤维融合定位基因发现，TasA 纤维锚定在未用 D-Tyr 处理的薄膜细胞上。相反，D-Tyr 处理的细胞大部分由未被 TasA 纤维修饰的细胞和未锚定到细胞的纤维聚集体组成。说明 D-Tyr 损害 TasA 纤维对细胞的锚定，进而影响生物膜。D-Tyr 还能显著降低 *E. coli* 和 *B. subtilis* 表面附着能力，使细胞相互脱离。通过诱导胞外蛋白发生变化，进而导致生物膜结构和组成的变化，抑制菌体生物膜的形成，并进一步分解生物膜。不同的 D-Tyr 浓度可能涉及不同的机制，它们可能具有物种特异性[47]。

5. NCDAAs 参与 PG 合成的应用

NCDAAs 参与 PG 合成的现象使利用外源添加物质来检测细胞壁动态过程成为可能。FDAAs（Fluorescent D-amino acids）是一种能够在多种细菌中有效地原位标记 PG 的荧光衍生物，可特异性探测细胞壁形成/重塑、细菌生长和细胞形态。Fura 等[15]将 FDAAs 添加到 *B. subtilis* 培养基中，通过观测荧光变化监测 PBPs 的 TP 活性变化。Kuru 等[48]利用 FDAAs 标记的 PG 进行定时脉冲，阐明了“捕食者和猎物”两种细菌细胞壁不同阶段的动态变化。入侵的“捕食者”会穿过“猎物”细菌的外膜，在其细胞壁中降解某些物质形成孔道，进入后重新密封孔道并修改 PG，最终实现细菌动态入侵的可视化。随着对 FDAAs 的不断深入研究，其发射波长跨越整个可见光谱，实现了 G^-和 G^+细菌中 PG 合成的可视化[49]。

万古霉素，一种大分子量（MW 1485.7）的亲水性分子，是临床上重要的抗生素。其荧光衍生物对 G^+菌具有特异性，但对 G^-细菌没有影响，因为它们的外膜对这种药物起渗透性屏障作用[3, 50-52]。万古霉素与荧光标记物（FLUOS）结合形成荧光衍生物（Van-FL），其可与新合成 PG 多肽链末端 D-Ala-D-Ala 结合，标记追踪 PG 的合成，是探测 PG 拓扑结构合成的灵敏工具，对细菌细胞壁的研究具有重要的应用前景。Daniel 等[47]用荧光显微镜观察 Van-FL 标记的细菌，探测细菌新生壁的合成情况。发现在 *B. subtilis* 中，新生或分裂部位染色最强烈，且新生 PG 的合成是螺旋模式。Lam 等[3]为了监测 D-AAs 混合物加入培养基后细胞壁的合成情况，使用 Van-FL 标记细胞壁前体脂质体 II。发现 D-AAs 混合物加入 30 分钟后，细菌侧壁的 Van-FL 染色大大减少，新生 PG 合成的差异，导致不同时期染色强度也有差异。

6. 展望

D-AAs 参与细胞壁合成的机制和相关应用研究受到越来越广泛的关注。D-AAs 的抑菌功能使其成为生物杀菌的研究重点，与 Nisin 结合可为疾病治疗提供支持。D-AAs 的功能性作用以及它们与细菌生态学的关系仍是未来研究的主题。虽然氨基酸是人体的营养物质，但仍需要进一步研究氨基酸作为药物的安全性以及实用性。此外，D-AAs 进入细胞参与代谢的机理尚未明确，参与反应的相关酶还需深入研究。基于 D-AAs 检测方法和拓展技术的不断完善，为之后的科学研究提供技术支持，为多学科相互借鉴和深入研究奠定了基础。

参考文献

[1] Radkov A D, Moe L A. Bacterial synthesis of D-amino acids [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2014, 98(12): 5363-5374.

[2] Gao X, Ma Q, Zhu H. Distribution, industrial applications, and enzymatic synthesis of D-amino acids [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2015, 99(8): 3341-3349.

[3] Lam H, Oh D C, Cava F, et al. D-amino acids govern stationary phase cell wall remodeling in bacteria [J]. Science, 2009, 325(5947): 1552-1555.

[4] Cava F, Lam H, de Pedro M A, et al. Emerging knowledge of regulatory roles of D-amino acids in bacteria [J]. Cellular & Molecular Life Sciences, 2011, 68(5): 817-831.

[5] Cava F, de Pedro M A, Lam H, et al. Distinct pathways for modification of the bacterial cell wall by non-canonical D-amino acids [J]. EMBO Journal, 2011, 30(16): 3442-3453.

[6] Patel K, Singh G K, Patel D K. A Review on Pharmacological and Analytical Aspects of Naringenin [J]. Chinese Journal of Integrative Medicine, 2018, 24(7): 551-560.

[7] Monselise E B, Levkovitz A, Kost D. Ultraviolet radiation induces stress in etiolated Landoltia punctata, as evidenced by the presence of alanine, a universal stress signal: a (15) N NMR study [J]. Plant Biology, 2015, 17(1): 101-107.

[8] Hirano T, Tanidokoro K, Shimizu Y, et al. Moss Chloroplasts are Surrounded by a Peptidoglycan Wall Containing D-Amino Acids [J]. Plant Cell, 2016, 28(7): 1521-1532.

[9] Hener C, Hummel S, Suarez J, et al. d-Amino Acids Are Exuded byArabidopsis thalianaRoots to the Rhizosphere [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2018, 19(4): 1109.

[10] Takaaki K, Tohru K, Takuro N, et al. Enantioselective Utilization of D-Amino Acids by Deep-Sea Microorganisms [J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7: 511.

[11] Aliashkevich A, Alvarez L, Cava F. New Insights Into the Mechanisms and Biological Roles of D-Amino Acids in Complex Eco-Systems [J]. Front Microbiol, 2018, 9: 683.

[12] Kolodkin-Gal I, Romero D, Cao S, et al. D-amino acids trigger biofilm disassembly [J]. Science, 2010, 328(5978): 627-629.

[13] Jones R M, Jr., Popham D L, Schmidt A L, et al. Vibrio fischeri DarR directs responses to d-aspartate and represents a group of similar LysR-type transcriptional regulators [J]. Journal of Bacteriology, 2018, 200(15): e00773.

[14] Vollmer W, Blanot D, de Pedro M A. Peptidoglycan structure and architecture [J]. FEMS Microbiology Reviews, 2008, 32(2): 149-167.

[15] Fura J M, Kearns D, Pires M M. D-Amino Acid Probes for Penicillin Binding Protein-based Bacterial Surface Labeling [J]. Journal of Biological Chemistry, 2015, 290(51): 30540-30550.

[16] Veiga P, Piquet S, Maisons A, et al. Identification of an essential gene responsible for D-Asp incorporation in the Lactococcus lactis peptidoglycan crossbridge [J]. Molecular Microbiology, 2006, 62(6): 1713-1724.

[17] Navarre W W, Schneewind O. Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope [J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 1999, 63(1): 174-229.

[18] Peltier J, Courtin P, El M I, et al. Clostridium difficile has an original peptidoglycan structure with a high level of N-acetylglucosamine deacetylation and mainly 3-3 cross-links [J]. Journal of Biological Chemistry, 2011, 286(33): 29053-29062.

[19] Lupoli T J, Tsukamoto H, Doud E H, et al. Transpeptidase-mediated incorporation of D-amino acids into bacterial peptidoglycan [J]. Journal of the American Chemical Society, 2011, 133(28): 10748-10751.

[20] Yoshimura T, Esaki N. Amino Acid Racemases: Functions and Mechanisms [J]. Journal of Bioscience & Bioengineering, 2003, 96(2): 103-109.

[21] Azam M A, Jayaram U. Inhibitors of alanine racemase enzyme: a review [J]. Journal of Enzyme Inhibition & Medicinal Chemistry, 2016, 31(4): 517-526.

[22] Arias C A, Weisner J, Blackburn J M, et al. Serine and alanine racemase activities of VanT: a protein necessary for vancomycin resistance in Enterococcus gallinarum BM4174 [J]. Microbiology, 2000, 146(7): 1727-1734.

[23] Kuan Y C, Kao C H, Chen C H, et al. Biochemical characterization of a novel lysine racemase from Proteus mirabilis BCRC10725 [J]. Process Biochemistry, 2011, 46(10): 1914-1920.

[24] Radkov A D, Moe L A. Amino Acid Racemization in Pseudomonas putida KT2440 [J]. Journal of Bacteriology, 2013, 195(22): 5016-5024.

[25] Stadtman T C, Elliott P. STUDIES ON THE ENZYMIC REDUCTION OF AMINO ACIDS [J]. Journal of Biological Chemistry, 1957, 231(2): 983-997.

[26] Fisher S L. Glutamate racemase as a target for drug discovery [J]. Microbial Biotechnology, 2010, 1(5): 345-360.

[27] Mortuza R, Aung H L, Taiaroa G, et al. Overexpression of a newly identified d-amino acid transaminase in Mycobacterium smegmatis complements glutamate racemase deletion [J]. Molecular Microbiology, 2018, 107(2): 198-213.

[28] Awasthy D, Bharath S, Subbulakshmi V, et al. Alanine racemase mutants of Mycobacterium tuberculosis require D-alanine for growth and are defective for survival in macrophages and mice [J]. Microbiology, 2012, 158(2): 319-327.

[29] Pal M, Bearne S L. Inhibition of glutamate racemase by substrate–product analogues [J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2014, 24(5): 1432-1436.

[30] Oh S Y, Richter S G, Missiakas D M, et al. Glutamate racemase mutants of Bacillus anthracis [J]. Journal of Bacteriology, 2015, 197(11): 1854-1861.

[31] Hernandez S B, Cava F. Environmental roles of microbial amino acid racemases [J]. Environ Microbiol, 2016, 18(6): 1673-1685.

[32] Espaillat A, Carrasco-Lopez C, Bernardo-Garcia N, et al. Structural basis for the broad specificity of a new family of amino-acid racemases [J]. Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography, 2014, 70(1): 79-90.

[33] Kawakami R, Ohmori T, Sakuraba H, et al. Identification of a novel amino acid racemase from a hyperthermophilic archaeon Pyrococcus horikoshii OT-3 induced by d -amino acids [J]. Amino Acids, 2015, 47(8): 1579-1587.

[34] Kawakami R, Sakuraba H, Ohmori T, et al. First characterization of an archaeal amino acid racemase with broad substrate specificity from the hyperthermophile Pyrococcus horikoshii OT-3 [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2017, 124(1): 23-27.

[35] Mutaguchi Y, Ohmori T, Wakamatsu T, et al. Identification, Purification, and Characterization of a Novel Amino Acid Racemase, Isoleucine 2-Epimerase, from Lactobacillus Species [J]. Journal of Bacteriology, 2013, 195(22): 5207-5215.

[36] Tanizawa K, Asano S, Masu Y, et al. The primary structure of thermostable D-amino acid aminotransferase from a thermophilic Bacillus species and its correlation with L-amino acid aminotransferases [J]. Journal of Biological Chemistry, 1989, 264(5): 2450-2454.

[37] Fotheringham I G, Bledig S A, Taylor P P. Characterization of the genes encoding D-amino acid transaminase and glutamate racemase, two D-glutamate biosynthetic enzymes of Bacillus sphaericus ATCC 10208 [M]. 1998. 80(16): 4319-4323.

[38] McPherson D C, Popham D L. Peptidoglycan Synthesis in the Absence of Class A Penicillin-Binding Proteins in Bacillus subtilis [J]. Journal of Bacteriology, 2003, 185(4): 1423-1431.

[39] Hammes W, Schleifer K H, Kandler O. Mode of Action of Glycine on the Biosynthesis of Peptidoglycan [J]. Journal of Bacteriology, 1973, 116(2): 1029-1053.

[40] Caparrós M, Pisabarro A G, Pedro M A D. Effect of D-amino acids on structure and synthesis of peptidoglycan in Escherichia coli [J]. Journal of Bacteriology, 1992, 174(17): 5549-5559.

[41] Sonenshein A L, Hoch J A, Losick R. The Gram-Positive World. (Book Reviews: Bacillus subtilis and Other Gram-Positive Bacteria. Biochemistry, Physiology, and Molecular Genetics.)[J]. Science, 1994, 263:546-548.

[42] Daniel R A, Williams A M, Errington J. A complex four-gene operon containing essential cell division gene pbpB in Bacillus subtilis [J]. Journal of Bacteriology, 1996, 178(8): 2343-2350.

[43] Lebar M D, May J M, Meeske A J, et al. Reconstitution of peptidoglycan cross-linking leads to improved fluorescent probes of cell wall synthesis [J]. Journal of the American Chemical Society, 2014, 136(31): 10874-10877.

[44] Hills G M. Chemical factors in the germination of spore-bearing aerobes; the effect of yeast extract on the germination of Bacillus anthracis and its replacement by adenosine [J]. Biochemical Journal, 1949, 45(3): 353-362.

[45] Alvarez L, Aliashkevich A, de Pedro M A, et al. Bacterial secretion of D-arginine controls environmental microbial biodiversity [J]. ISME J, 2018, 12(2): 438-450.

[46] Tong Z, Zhang L, Ling J, et al. An in vitro study on the effect of free amino acids alone or in combination with nisin on biofilms as well as on planktonic bacteria of Streptococcus mutans [J]. PLoS One, 2014, 9(6): e99513.

[47] Yu C, Li X, Zhang N, et al. Inhibition of biofilm formation by D-tyrosine: Effect of bacterial type and D-tyrosine concentration [J]. Water Research, 2016, 92(2):173-179.

[48] Kuru E, Lambert C, Rittichier J, et al. Fluorescent D-amino-acids reveal bi-cellular cell wall modifications important for Bdellovibrio bacteriovorus predation [J]. Nature Microbiology, 2017, 2(12): 1648-1657.

[49] Hsu Y P, Rittichier J, Kuru E, et al. Full color palette of fluorescent d-amino acids for in situ labeling of bacterial cell walls [J]. Chemical Science, 2017, 8(9): 6313-6321.

[50] Vuorio R, Vaara M. Mutants carrying conditionally lethal mutations in outer membrane genes omsA and firA (ssc) are phenotypically similar, and omsA is allelic to firA [J]. Journal of Bacteriology, 1992, 174(22): 7090-7097.

[51] Daniel R A, Errington J. Control of Cell Morphogenesis in Bacteria [J]. Cell, 2003, 113(6): 767-776.

[52] Doroshenko N, Tseng B S, Howlin R P, et al. Extracellular DNA impedes the transport of vancomycin in Staphylococcus epidermidis biofilms preexposed to subinhibitory concentrations of vancomycin [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2014, 58(12): 7273-7282.